

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑭ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報(A)

昭63-233915

⑰ Int.Cl.⁴

A 61 K 9/10

識別記号

3 2 7

庁内整理 号

A-6742-4C
R-6742-4C

⑱ 公開 昭和63年(1988)9月29日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全24頁)

⑲ 発明の名称 両親媒性物質会合活性成分を取り込んだ運搬担体

⑳ 特 願 昭62-317282

㉑ 出 願 昭62(1987)12月15日

優先権主張 ㉒ 1986年12月15日 ㉓ 米国(US) ㉔ 942,093

㉕ 発 明 者 クリスピン・ジョー アメリカ合衆国、カリフォルニア、92635、フラート
ジ・スチュワート・エ ン、ウエスト・ハーモサ・ドライブ・650
レイ㉖ 発 明 者 ボール・ガードナー・ アメリカ合衆国、カリフォルニア、91108、サン・マリ
シュミット ノ、ユークリッド、アベニュー・1730㉗ 発 明 者 ゲーリー・フジイ アメリカ合衆国、カリフォルニア、90504、トーレンス、
テイラー・コート・16933㉘ 出 願 人 ベスター・インコーポ アメリカ合衆国、カリフォルニア、91106、パサディー
レイテッド ナ、イースト・ウォールナット・ストリート・939

㉙ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

両親媒性物質会合活性成分を取り込んだ運
搬担体

2. 特許請求の範囲

(1) 直径が約20〜約10,000nmのサイズ
を有する、1以上の活性成分相、該活性成分相と
両親媒性物質が会合して生じた1種以上の両親媒
性物質会合基質、および外側の層は生物学的適合
性のある、該両親媒性物質会合基質と会合した少
なくとも1層のカプセル層を含む少なくとも1層
のカプセル層を含んで成る、活性成分運搬担体。(2) 前記活性成分が診断薬および治療薬より選
択された物質から成る、特許請求の範囲第1項に
記載の運搬担体。(3) 前記両親媒性物質が、少なくとも1種の、
脂肪酸、フォスファチジン酸、リン脂質、ジグリ
セリド、トリグリセリド、アルコール、アミン、フォスフェート、および/またはスルフェートか
ら成る、特許請求の範囲第1項または第2項に記
載の運搬担体。(4) 前記両親媒性物質が脂肪酸またはフォスファ
チジン酸から成る、特許請求の範囲第3項に記載
の運搬担体。(5) 前記両親媒性物質が、炭素数10ないし
28の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を有する脂肪酸、
および/または1種以上の炭素数10ないし28
の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を有するフォスファチ
ジン酸から成る、特許請求の範囲第4項に記載の
運搬担体。(6) 前記両親媒性物質が、前記1以上の活性成
分相と会合した親水性部分、および前記カプセル
の1層と会合した親水性部分を含有する、特許請
求の範囲第1項ないし第5項のいずれかに記載の
運搬担体。

(7) 前記親水性部分が、カルボキシル基、水酸

基、アミノ基、フォスファート基、またはスルファート基を含んで成る特許請求の範囲第6項に記載の運搬担体。

(8) 前記疎水性部分が、脂肪酸炭化水素、脂環式炭化水素、芳香族炭化水素置換脂肪酸炭化水素、脂環式炭化水素置換脂肪酸炭化水素、またはポリオキシエチレン基を含んで成る、特許請求の範囲第6項または第7項に記載の運搬担体。

(9) 前記疎水性部分が、炭素数10ないし28の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖から成る、特許請求の範囲第6項ないし第8項のいずれかに記載の運搬担体。

(10) 前記生物学的適合性カプセル層がリン脂質物質を含んで成る、特許請求の範囲第1項ないし第9項のいずれかに記載の運搬担体。

(11) 単一の前記カプセル層を有し、更に該カプセル層が外面の生物学的適合性カプセル層をも構成する、特許請求の範囲第1項ないし第10項

前記リン脂質物質が1個以上の炭素数10ないし20の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を含んで成る、特許請求の範囲第1項ないし第15項のいずれかに記載の運搬担体。

(17) 前記両親媒性物質が、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、ドコサン酸、テトラコサン酸、ジミリスチルフォスファチジン酸、ジパルミトイルフォスファチジン酸、ならびにジステアロイルフォスファチジン酸より選択された少なくとも1種の脂肪酸を含んで成り、さらに、前記リン脂質物質が1個以上の炭素数10ないし20の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を有するフォスファチジルコリンを含んで成る、特許請求の範囲第16項に記載の運搬担体。

(18) 前記両親媒性物質が、ラウリン酸、ミリスチン酸もしくはパルミチン酸を含んで成り、さらに、外面の生物学的適合性のあるカプセル層および少なくとも1種以上の前記マグネタイト両親

媒のいずれかに記載の運搬担体。

(12) 直径が約20nm〜約10,000nmのサイズを有する、特許請求の範囲第1項ないし第11項のいずれかに記載の運搬担体。

(13) 直径が約35nm〜約100nmのサイズを有する、特許請求の範囲第1項ないし第12項のいずれかに記載の運搬担体。

(14) 直径が約50nm〜約80nmのサイズを有する、特許請求の範囲第13項に記載の運搬担体。

(15) 直径が約20nm〜約100nmのサイズを有する、特許請求の範囲第12項に記載の運搬担体。

(16) 前記両親媒性物質が、炭素数12ないし18の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を有する脂肪酸、炭素数22ないし24の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を有する脂肪酸、および/または1個以上の炭素数12ないし18の鎖長の脂肪酸炭化水素鎖を有するフォスファチジン酸を含んで成り、さらに、

媒性物質会合基質と会合した少なくとも1層のカプセル層を含む少なくとも1層のカプセル層を有し、該1層以上のカプセル層が、コレステロールと、ジミリスチルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリンおよびジステアロイルフォスファチジルコリンより選択されたフォスファチジルコリンとの混合物を含んで成る、特許請求の範囲第1項ないし第17項のいずれかに記載の運搬担体。

(19) 活性成分がマグネタイトである特許請求の範囲第1項ないし第18項のいずれかに記載の運搬担体。

(20) 活性成分が治療薬である、特許請求の範囲第1項ないし第18項のいずれかに記載の運搬担体。

(21) 前記治療活性成分が抗新生物薬を含んで成る、特許請求の範囲第20項に記載の運搬担体。

(22) 前記抗新生物薬がビスアントレンもしくは

はシスプラチンである、特許請求の範囲第21項に記載の運搬担体。

(23) 前記治療活性成分が抗真菌薬を含んで成る、特許請求の範囲第20項に記載の運搬担体。

(24) 前記抗真菌薬がアンフォテリシンBもしくはミコナゾールである、特許請求の範囲第23項に記載の運搬担体。

(25) 活性成分相と両親媒性物質とを会合させて両親媒性物質会合基質を生成させること、および、外周は生物学的適合性のある、該両親媒性物質会合基質と会合した少なくとも1層のカプセル層を含む少なくとも1層のカプセル層内に該両親媒性物質会合基質をカプセル化することを特徴とする、特許請求の範囲第1項ないし第24項のいずれかに記載の運搬担体の製造法。

(26) 前記両親媒性物質の親水性部分と前記活性成分相との会合を形成させる工程、および前記両親媒性物質の疎水性部分と前記カプセルの1層

との会合を形成させる工程を含むことを特徴とする特許請求の範囲第25項に記載の方法。

(27) ヒトもしくは動物の体に対する治療もしくは外科的処置による処理法、またはヒトもしくは動物の体に対して行う診断法において使用する、特許請求の範囲第1項ないし第24項のいずれかに記載の運搬担体。

(28) ヒトもしくは動物の体に対して実施する核磁気共鳴測定撮影法において使用する、特許請求の範囲第19項に記載の運搬担体。

(29) ヒトもしくは動物体内の新生物疾患の治療法において使用する、特許請求の範囲第21項または第22項に記載の運搬担体。

(30) ヒトもしくは動物の体に施す抗真菌療法において使用する、特許請求の範囲第23項または第24項に記載の運搬担体。

(31) 薬理学的に許容性のあるキャリア中に、特許請求の範囲第1項ないし第30項のいずれかに記載の運搬担体を含む薬剤組成物。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、外部の生物学的適合性の良いカプセル層(encapsulating layer)、内部の両親媒性の活性成分会合層、および活性成分であるカプセル化物質(encapsulated material)から成る活性成分の運搬担体組成物(delivery vehicle composition)する。また、本発明は、そのような組成物の調製法をも提供する。これらの組成物は、非水溶性または水溶性の活性成分を目的の領域に溶解するのに、特に、体組織もしくは他の体系への*in vivo*運搬のために活性成分を溶解するのに適している。特定の組織、器官もしくは細胞に対する組成物の特異的標的化または蓄積が可能になると同時に、活性成分の溶解性ならびに血清安定性の向上も得られる。本発明で使用に適した活性成分には、核磁気共鳴測定法等に用いるマグネタイトのような超常磁性及び強磁性物質、

X線コントラスト造影法等に用いるハロゲン化合物、放射線写真用のラジオアイソトープ化合物、およびタンパク、酵素、抗新生物薬、抗真菌薬等を含む診断薬ならびに治療薬が挙げられる。

[従来技術とその問題点]

単一層または多重層ベシクルの形態をとるリン脂質ミセ粒子は、リボソームとしても知られているが、多数の場合において活性成分の可溶化および運搬用の運搬担体として用いられている。リボソームは、以下の観点から、*in vivo*運搬系に極めて有利な場合のあることが証明されている：生物学的適合性、他の方法では不溶性および/または毒性の活性成分の隔離ならびに可溶化能、および目的とする特定の組織もしくは体系への活性成分の選択的運搬能。

少なくとも1960年の初頭から、強磁性液体を得るために、強磁性体を液状運搬キャリアに可溶化する努力が払われてきた。その1例として、

マグネタイト、すなわち、塩化鉄(Ⅱ)ならびに塩化鉄(Ⅲ)のアルカリ溶液からしばしば沈澱によって生成する化学式 Fe_3O_4 の強磁性体のそれが上げられる。この種の沈澱法の実例は、Mannら[J.C.S. Chem. Comm., 1067-1068(1979)]、Khalafallaら[IEEE Trans. Magnetics, vol. MAG-16, No.2, 178-183(March 1980)]、およびMoldayら[J. Immunological Method, vol.52, 353-367(1982)]の記載によるものが挙げられる。マグネタイトには、核磁気共鳴測定法における緩和時間T₂のエンハンサーとしての作用力が文献で認められている(Ohgushiら[J. Magn. Res., vol.29, 599-601(1978)]参照)。

マグネタイトの可溶化に成功した技術は数多く開発されてきたが、マグネタイトが循環時間、血清安定性、および生物学的体適合性が優れているので運搬担体としてin vivoでの使用に適していることを示したのは本発明が初めてである。例え

合し、親油性炭化水素の尾部が非極性運搬キャリアの溶液と適合するように外側に露出した界面活性剤の単一コーティング層を含んで成るベシクルを形成していることである。この種の組成物は、体内における水性環境での可溶化に適していない。

水性または極性溶液によるマグネタイト懸濁液も得られている。マグネタイト上でのドデシルアミンまたはドデカン酸による単一層界面活性剤コートは、強磁性体を分散させることが示されており、後者の界面活性剤によれば稀釈安定性の(dilution-stable)分散が生じる。これは、Charlesら[IEEE Trans. Magnetics, vol. MAG-16, No.2, 178-183(March 1980)]の報告に見られる。分散剤として石油スルフォネートを用いた鉄水溶液(aqueous ferrofluids)は、Kelleyの米国特許第4,019,994号(1977)に記載されている。このような単一層の界面活性剤コート粒子の構造は、溶液層に露出した短い(疎水性の低い)炭化水素

ば、従来技術に基づく、未コートまたはコーティングを施したマグネタイト粒子は、非常に短時間(通常は1時間以内、多くは5分以内)で血中から除去されるのが一般的である。さらに、そのような粒子の適切な可溶化を行わなければ、体内で凝集の生じる可能性があり、結果的に悪影響を及ぼすことがある。

非水性溶液へのマグネタイトの可溶化は、オレイン酸等の界面活性剤の存在下で当該物質のボールミル処理、界面活性剤を使用する適当な溶液中への溶解、および関連の方法によって行われてきた。これらの方法に関しては、Charlesら[IEEE Trans. Magnetics, vol. MAG-16, No.2, 172-177(March 1980)]、Khalafallaら[米国特許第3,784,540号(1973)]、およびReimersら[米国特許第3,843,540号(1974)]を参照のこと。そのような非水性、非極性溶液によるマグネタイト懸濁液の特徴は、極性の頭部がフェライト表面に会

尾部による凝集の抑制、および水溶性の保持という点で、上記の非水溶性可溶化マグネタイト粒子のそれと類似している。

安定なマグネタイト粒子の水性懸濁液は、表面の二重層を生成するイオン性ならびに非イオン性界面活性剤を用いても得られる。このような構造は、単一層の場合と同様にマグネタイト粒子上をコートした両親媒性分子の内部層、および水性/極性溶液に対して親水性尾部が内側に向って配列し、親水性頭部が外側に向って露出した配向を取った界面活性剤の外部層を含んでいる。内部層は、オレイン酸で構成される場合が多い。外部層の界面活性剤に用いられる物質として、脂肪酸ならびにその塩、長鎖エーテルもしくはエステル、およびアルキルアリアルポリエーテルのようなアルキル化芳香族化合物が挙げられる。このような二重層組成物の例は、Shinoizaka, 日本国特許第51-44580号(1976)、およびSambucetti, IEEE

Trans. Magnetics, vol. MAG-10, No. 2, 365-367 (March 1980)に示されている。今までにマグネタイト粒子の可溶化に関する有効性が示されてきた外部層の界面活性剤は、しかしながら*in vivo*での使用には適していない。これらの界面活性剤はそれ自体毒性があり、さらに、血液中で急速に分解してカプセル化物質の有害な凝集を引き起こす可能性によるためである。

その他、マグネタイトの*in vivo*投与を行うための調製法には、マイクロメーターレベルの炭水化物マトリックスへ粒子の付着 [Olssonら, Proc. Soc. Magn. Res. Med., 888頁(4th Ann. Mtg. 1985年8月)、およびOlssonら, Magn. Res. Imaging, vol. 4, No. 2, 142-143(1988)]、およびムコ多糖類のキトサンを用いたマグネタイトのコーティング [Yeoら, 米国特許第4,285,818号(1981)]が挙げられる。そのような組成物は、血清中では恐らく安定に存在し得るが、細胞内皮系に

成分にもあてはまる。特に、そのような成分は粒子状、非水溶性もしくは性質上毒性を示すかも知れず、または体内の特定部位へそのような成分を運搬することが有益もしくは必須となり得る。さらに、従来の運搬担体は、血清安定性が不十分であって、安全な方法による最良の結果を得られないことが多い。

従って、本発明では、磁性体ならびに他の造影剤を含む治療もしくは診断薬のような活性成分を、良好な結果を得るための有効量で体内に安全かつ特異的に運搬し得る組成物ならびに方法の改善を進める必要性について論じる。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明は、生体内で可溶性または不溶性の活性成分を運搬し得る、生物学的適合性に優れた組成物に関する。この組成物は、活性成分および両親媒性物質を含む第一の層を含んで構成されており、両親媒性物質は活性成分と両親媒性分子の極性頭

によって血液循環から速やかに除去されるであろう。薬剤およびフェライトを含み、磁氣的に局在化可能な重合リボソームは、Cheng, 米国特許出願第714,711号(1985年3月12日)に記載されている。さらに、単一の二重膜フォスファチジルコリンベシクルの封入容器内へのマグネタイトのカプセル化、および核磁気共鳴測定への使用に関する提案は、Masonら, J.C.S. Chem. Comm., 1067-1068(1979)に記載されている。しかし、上記の観点では、この種のベシクルの有効性および安全性は示されていない。更に、そこに記載された組成物は、*in vivo*の安定性に限界があり、造影剤としては好ましくないであろう。ところが、本発明の運搬担体は、37℃で血清中の安定性が極めて高く、循環時間の延長が可能であり、そして、生物学的適合性に優れている。

*in vivo*での使用に適した可溶型マグネタイトの調製に関する固有の問題は、しばしば他の活性

部との合金によって固体活性成分をカプセル化またはこれと合金し得る。第二の外部層は、運搬担体に全体として生物学的適合性を付与する方法を用いて両親媒性物質のコート構造をカプセル化またはこれとの合金が可能な物質(例えば、リン脂質等)を含んで成っている。適当な「生物学的適合性を有する」運搬担体というのは、元々の組成物としても分解産物としても受容体に対し毒性および免疫原性がないものであろう。従って、元の組成物中のカプセル化外部層は、受容体に生物学的適合性のある「表面」を示すものでなければならず、運搬担体が体内で分解された場合に、それ自体生物学的適合性を有する物質から構成されていることが望ましい。外部層がリン脂質で構成されている場合、フォスフォグリセリドの親脂性尾部が両親媒性物質の親脂性尾部と合金するため、両親媒性の活性成分構造はリン脂質層中で安定化される。また、フォスフォグリセリドの極性頭部

が*in vivo*環境中に露出するため、組成物は安定化する。このような組成物は露出表面におけるフォスホグリセリドの性質によって生物学的に適合し、さらに、血中で高い安定性を示すため、体内で長期の閉鎖が可能になる。

本発明の組成物を使用する際に適した活性成分の特徴は、それらが両親媒性により凝集体として効果的にカプセル化され、もしくは分子レベルで1分子以上の両親媒性分子と会合し得るという点にある。マグネタイトのような微結晶構造は、活性成分にとって適切な構造であり、これは放射性核種、X線コントラスト造影剤等の場合と同様である。治療薬、例えば、抗真菌薬のアムフォテラシンBならびにミコナゾール、および化学療法剤のビサントレンならびにシスプラチンも、両親媒性物質によるカプセル化またはこれとの会合性が優れた薬剤と考えられている。活性成分のサイズは、個々の分子から直径60nm以上の凝集体の

来技術として知られる、リボソームを用いた方法と同様に、特定の器官、組織、細胞、またはその他の体内系を標的とすることができる。従って、

腫瘍細胞等の特定細胞、または肝臓もしくは脾臓等の特定器官を、分光測定薬、放射線測定薬、医薬、またはその他の薬剤の運搬の選択的な標的とすることができる。さらに、両親媒性層およびリン脂質層によりカプセル化することにより、活性成分が効果的に隔離されるので、活性成分の如何なる毒性も低下させられおよび/または体内の特定の部位を標的とし得る。そして、本運搬体を用いれば、37℃における薬剤の循環時間および血中で安定性が増大する。

従って、本発明における一つの目的は、ヒトもしくは他の哺乳類の体内に活性成分の有効量を安全に運搬し、有益な効果をあげることが可能な、新規で優れた組成物を提供するものである。しかし、*in vivo*への投与が唯一の想定態様ではなく、

大きさもしくは粒子の大きさに互っている。活性成分が個々の分子の場合、各分子は1個というような少ない両親媒性分子と会合している可能性もある。

両親媒性物質の特徴は、それらが外側の生物学的適合性物質の層でカプセル化されるという点であろう。所与の薬剤に最も有効な特定の両親媒性物質の型は、活性成分および周囲の生物学的適合性物質の性質に依存するであろう。疎水鎖の炭素数が10ないし28の飽和または不飽和脂肪酸が特に有効であり、活性成分がマグネタイトの場合、ミリスチン酸（炭素数14の鎖長）が特に望ましい。ジアルコイルフォスファチジン酸も有効な両親媒性物質であり、パルミチン酸とジステアロイルフォスファチジン酸の両者は、活性成分がアムフォテラシンBの場合での効果的な両親媒性物質であることが示された。

リン脂質カプセル化運搬体を使用すれば、使

活性成分の可溶性の増大を含む本発明に固有の利点は、*in vitro*もしくはその他の非生体系への利用、またはその他の運用が可能である。

本発明のもう一つの目的は、磁気物質、放射線測定用物質、X線コントラスト造影剤、または他の生物学的造影剤を体内に運搬するための組成物を提供することである。特に、これらの組成物は、核磁気共鳴造影の目的でマグネタイト等の強磁性体を運搬する点で有用である。

更に別の目的は、これらの組成物によって有効量の治療薬を安全な方法で運搬する手段を提供することである。

本発明は、ここに開示した組成物の調製法をも提供するものである。

本発明は、水溶性または非水溶性活性成分のカプセル化および*in vivo*系における改良運搬のための組成物を提供する。これらの組成物の利点は、リボソーム構造を本質的に必要とするものでし、

リン脂質だけから成されているものでもないが、外側のリン脂質コーティングによりリボソーム様運搬担体またはベシクルと結びついている。この種の運搬担体を用いれば、溶解度の低い、または従来の方法による投与では刺激性の原因となったり、異なった体内分布様式で運搬すべき活性成分の取り込み、および運搬が可能である。

本発明のベシクル様(vesicular)運搬担体中にカプセル化される活性成分には、広範な治療薬および診断薬が含まれる。適当な治療薬としては、鎮痛剤、抗凝固剤、抗生物質、抗真菌薬、抗炎症剤、抗新生物薬、抗寄生虫薬、抗ウィルス剤、心臓血管薬剤、細胞受容体結合分子、神経伝達物質、点眼剤、~~ホルモン~~多糖類、および酵素、ホルモン、糖タンパク、免疫調節薬等を含むタンパクが挙げられる。適当な診断薬関連の活性成分としては、血管造影法、CTスキャン撮影法、核磁気共鳴撮影法、ラジオグラフィ、X線造影法、超音波検査法等

れてカプセル化され得る。

第2図は、本発明の組成物の1形態を示したものである。この形態において、活性成分は、リボソーム様のリン脂質二重膜内の疎水性領域への取り込みおよびカプセル化が生じることによって、外側のカプセル層と会合する。この型の安定構造に達するためには、活性成分相と運搬担体のカプセル層との会合を含めて、活性成分がカプセル層のこの疎水性二重膜内領域と適合することが必須条件である。本発明によれば、この適合性が得られるのは、活性成分に対して使用された両親媒性分子の層または他の活性成分会合基によるもので、この使用においては、両親媒性分子の親脂性部分が外側に露出させられ、疎水性二重膜内領域と相互作用を起こす。活性成分粒子とこれに会合した両親媒性分子とを含んで構成される構造を、本明細書では「両親媒性物質会合基質(Amphiphile-Associated Substrate)」(AAS)と称する。

に用いられる薬剤が挙げられる。診断用活性成分として特定の薬剤には、マグネタイトのような超常磁性体ならびに強磁性体、ハロゲン化合物、放射性同位化合物、蛍光物質、および色素が挙げられる。

第1図を参照すると、典型的な単層(unilamellar)リボソームベシクルは、リン脂質二重膜を有して成り、それによって囲まれた内空間は閉鎖構造を取っている。活性成分は、この内空間に取り込まれてカプセル化され、本明細書で「カプセル層」(この場合は、リン脂質二重膜)と呼ぶ層によって囲まれる。この領域に存在する極性溶液は、安定なリボソーム構造と適合する。それは、層内部の極性構造と内側のリボソーム層のリン脂質分子の内側に配向した極性部分との間に引力が作用するからである。また、親脂性の活性成分は、リボソームの疎水性二重膜内領域(intra-bilayer region)(すなわち、カプセル層内)に取り込ま

マグネタイトAAS中の活性成分は、リン脂質または他のカプセル化分子の親脂性部分と両親媒性分子の親脂性部分との分子間適合性および引力によって、二重膜内領域と会合し、その内部で安定化する。この層は、運搬担体外側のカプセル層を構成することができ、この場合、それは運搬担体が全体として生物学的に適合性を有する物質を含んで成っていることになる。また、多重層ベシクルのように、追加のカプセル層を有し、それ自体AASと会合するものもあり得る。運搬担体外側のカプセル層は、運搬担体を全体として生物学的に適合性を有するようにする物質、すなわち、受容体に対して許容レベルに非毒性および非免疫原性を有する物質を含んで構成されることになる。(勿論、活性成分を選択して、例えば、癌細胞を標的とする場合の毒性を調節することができる。)従って、外側の生物学的適合性を有するカプセル層は、受容体に対し無毒で免疫原性を与えないよ

うな「表面」でなければならない。さらに、運搬担体が体内で分解される時、その組成成分は非毒性かつ非免疫原性でなければならない。従って、体内で分解が生じるとき、単層または多層のカプセル層は、分解に際して生物学的に適合性を有する物質であることが好ましい。

第2図に示す活性成分相またはAASのサイズは、運搬担体を安定かつ有効性のある状態のまま、有意に変化させることができると考えられている。従って、活性成分がマグネタイトの場合、二重膜内の微結晶マグネタイト粒子の直径は、リン脂質二重膜(例えば、第1図のリボソームの例に見られるような、取り込まれた固体活性成分の如何なるものとも食合しないもの)の厚さの2倍以上にもすることができる。例えば、体内の組織または器官に活性成分を運搬するに有効なサイズのリボソームは、全体直径(overall diameter)が約35~100nm、好ましくは50~80nm、およびリ

造することができる。例えば、沈殿直後にマグネタイトを加熱したり、磁界の存在下または不存在下で沈澱物を持ち上げさせることができる。マグネタイトの運搬担体中への取り込み量を最大にするには、マグネタイトの調製法に応じて異なった条件を必要とすることがある。また、最大取り込み量は、マグネタイトの調製法に依存する場合もある。

特定の運搬担体と会合した活性成分の量を最大にすると、適切な活性レベル(磁力、放射線写真、その他の造影剤活性、および薬剤治療活性等)を得るのにしばしば有益となる。

特に、体内の特定領域または細胞を運搬担体の標的として扱う場合、運搬担体の全体サイズを考慮しなければならない。本明細書に示したリボソーム運搬剤、またはその他のリン脂質関連運搬剤のサイズを有意に変化させても、有効活性レベルは維持できると見られている。直径約50~80

nmリン脂質二重膜の「公称(nominal)」厚さが約4~7nm(如何なる活性成分もカプセル化しない時、膜内で相対する極性頭部基の間を測定した場合)である。平均直径約5~20nm(多くは、約11nm)のマグネタイト微結晶は、適当な両親媒性分子と会合して直径約15nmのAASを形成し、続いて、二重膜の公称厚さが約5nmに過ぎない、リボソームの全体直径が約60nmであるリン脂質ベシクルの二重膜内にカプセル化される。恐らく、そのような場合の二重膜構造は、比較的大きなサイズの活性成分を収容するために著しい変形に耐えることができるに違いない。しかし、本発明に関連した凍結断片および陰性染色電子顕微鏡撮影法においては、そのような構造を取り得ることが認められた。また、運搬担体としての有効性も示された。

マグネタイトは、一通の条件下で2個および3個の鉄塩化物溶液からのアルカリ沈澱によって製

造される。50nmの運搬担体は、腫瘍細胞のような特異的細胞を標的とする場合、特に有用なことが示された。さらに、上記のように、活性成分が直径約11nm以上のマグネタイト粒子の時、そのような運搬担体を用いた核磁気共鳴撮影法の有用性が認められている。

この点に関しては、有効量の活性成分がリボソーム膜内部の疎水性二重膜領域に取り込まれている完全リボソームベシクルをそのまま使用して、本発明を実行することができるということを認識することが重要である。そのような構造ではベシクル内部の封入空間がそのまま完全であるので、脂質に結合した最初の活性成分に加えて、第二の活性成分(例えば、溶液としての水溶性薬剤)をベシクル内に封入することができる。例えば、体内の特定領域を磁化治療薬等の薬剤の標的とする場合、または上記のようにカプセル化可能な2種類以上の活性成分を同時に運搬するのが適当な如

何なる応用においても、この種の構造は有用である。

致

リン脂質二重膜の公称厚さに比べて活性成分相が比較的大きいある場合においては、活性成分の単一の粒子状凝集体を単一の運搬担体に包含させることが可能と考えられている。第2図には、この種の運搬担体を例示する。しかし、1つ以上の活性成分凝集体を両親媒性物質でコートし、完全なリボソーム構造をそのまま保持しながら二重膜内領域に取り込ませられることも大いに期待できる。個々の活性成分凝集体のサイズを小さくすれば、より多くの凝集体を二重膜内に取り込ませることができる。さらに、活性成分を微細に分割する場合、または活性成分が個別の非凝集体分子の形で存在する場合、二重膜内部の疎水性領域で各活性成分単位またはAASの安定化を得るためには、活性成分の個々の粒子または分子に包含する両親媒性物質の量はそれだけ少なくなる。

によって本発明の特許請求の範囲が限定されるものではない。

先に説明し、第2図および第3図で示した構造は、小単層ベシクル(SUV)に類似したものである。カプセル層が同心円状となる構造も本発明の範囲内として利用され得る。これらは、多重層ベシクル(MLV)に類似した構造といえる。そのような場合同心円状カプセル二重膜は、上記のように、両親媒性物質会合基質を各々に取り込むことが可能である。この種の運搬担体において、外側のカプセル層には、体内で運搬担体の分解が生じてそれ自体生物学的適合性を有する物質が一般に含まれている。さらに、MLV様構造に存在する追加のカプセル層には、リン脂質のような生物学的適合物質が含まれる。そのような構造を取れば、既知のMLVと結びついた特性、すなわち、活性成分の遅延型放出、および活性成分のカプセル化量の増加ならびに生物学的適合性の内

活性成分が個別分子の場合、実際に二重膜内で活性成分を安定化させるには、両親媒性物質1分子の活性成分1分子との1対1の会合(1:1 association)で十分である。そのような場合、多数の両親媒性物質会合基質の粒子を二重膜内に取り込ませることも可能である。第3図にこの種の構造を示す。この構造に基づいて調整すれば、治療薬としての抗真菌薬、アンフォテリシンBを本発明の運搬担体に取り込ませることができると考えられている。

しかし、アンフォテリシンBを含む活性成分を、溶液系または個別分子から粒子状の凝集体の形態に構成することも明らかであり、そのような形態を取れば、本明細書に記載のように、両親媒性物質との会合またはそれによるコーティングが容易になり、運搬担体に取り込まれ易くなる。従って、ここで記載した特定の構造は、本発明の範囲を十分に記載するために例示したに過ぎず、これ

上等の性質が発現されよう。MLV様構造の一般的なサイズは、直径約100nmないし約10,000nm以上と言えよう。

本発明によると、第4図に例示した如く、活性成分をリン脂質コート構造内部に取り込ませることも想定できる。この場合、両親媒性物質でコートした活性成分またはAASは、リボソーム構造の二重膜内疎水性領域に封入されるのではなく、カプセル層に包囲される。この図では、カプセル層は単一層であって、リン脂質分子は、その疎水性尾部が内側に配向し両親媒性物質の疎水性部分と会合するような配向をとっている。一方、リン脂質分子の極性疎水性頭部は、水性溶液中で運搬担体が可溶化し得るよう外側を向いて配向している。さらに、外側をコーティングするリン脂質の特性によって、第1図および第3図で示した構造と同じようにin vivo系での生物学的適合性も与えられる。

リボソーム構造の二重膜内領域に封入するには大きすぎる活性成分相を収容するとき、第4図に示した構造が用いられる。活性成分相を大きくすれば、一定数の運搬担体当りより高濃度の活性成分を与えることができることは明らかである。また、リボソーム構造を取らない運搬担体(即ち、内側の閉入溶液相をもたない)、または典型的なリボソームと結びついた全体サイズよりも小さい全体サイズの運搬担体を得ることが望ましい。

第4図に示した種類の運搬担体のサイズは活性成分相のサイズによって変化する。直径約20~約100nmの運搬担体が特に有用であると考えられる。しかしながら、例えば第4図の構造が追加のカプセル層を有するMLV様構造に取り込まれるような場合には、より大きなサイズのものも使用できる。

第4図に示した構造の1例として、例えば、粒径が40nm~70nmの微結晶マグネタイトが挙げ

られ、子カプセル層でコートすることによって、生物学的適合性を有すると同時に体内の特定部位を標的とすることのできる、高濃度の水溶性形態のマグネタイトが得られる。

適当な両親媒性物質による調製活性成分のコーティング、または活性成分及び両親媒性物質の個々の分子間の会合は、通常、超音波処理およびホモゲナイズを含む種々の高剪断法によって実施できる。マグネタイトのような非水溶性の活性成分を用いる場合、一般に、超音波処理により両親媒性物質との会合に適した物質の水性分散液または懸濁液が得られ得る。最初の分散液自体は、超音波処理によって調製できる。リン酸緩衝食塩水(PBS)は、運搬担体が*in vivo*またはその他の生物学的関連の適用を目的とする場合、特にリン脂質もしくは他の物質による最終コーティングが、両親媒性物質によるコーティングに使用されるのと同じの溶媒バッチを用いて実施される場合に、

られる。この程度のサイズを有する粒子は、核磁気共鳴測定撮影法(nuclear magnetic resonance imaging)またはその他の用途の場合、ある種の腫瘍細胞を標的とする上で有用であることが分かっている。組織を核磁気共鳴測定撮影法によって調べる際の、マグネタイトの使用例は、PCT特許出願第PCT/N085/00017(Jacobsonら)、Sainiら、Magn. Res. Imaging, vol.4, No.2, 114 (1986)、Renshawら、Magn. Res. Med. vol.3, 217-225 (1986)、およびDiasら、Magn. Res. Med. vol.3, 328-330 (1986)に示されているが、その開示はここに引用して本明細書の一部とする。本明細書の例えば実施例6で論じるように、撮影応答(imaging response)を最大にする活性成分の濃度は容易に決定でき、静注もしくは局部注射、または経口投与のような周知の方法によって投与することができる。マグネタイト粒子を内側の単一層両親媒性分子および外側の単一層リン脂質分

特に有用な水溶性溶媒である。その他の緩衝水性溶媒およびブドウ糖のような成分を含む溶液を用いても、利用可能な活性成分の分散液が得られる。

非水性溶媒、または水性溶媒と非水性溶媒との混合物を用いた場合も、許容できる活性成分懸濁液が得られ、また、両親媒性物質による活性成分のコーティングまたはそれとの会合が適切に実施できる。例えば、PBS/クロロホルム等の水性/有機溶媒混合物を使用すれば、両親媒性物質/活性成分混合物のスプレー乾燥を行うことができる。同じように、2相両親媒性物質コーティング工程が望まれる場合、水性/有機溶媒混合物を用いることができる。

様々な状況に応じて、特定の調製法に適する両親媒性物質を選択することができる。両親媒性物質中での活性成分の単純な混合または溶解とは異なる両親媒性分子の極性部分および活性成分間に働く特異的相互作用力に起因して、両親媒性物質

分子と活性成分との所望の会合が生じる。そのような作用力は、例えば、両親媒性物質と活性成分間のイオン結合ならびに静電結合、共有結合、水素結合、化学吸着力、または物理吸着力のような性質を有すると考えられる。マグネタイトと（脂肪酸もしくは脂肪酸誘導体のような）イオン性もしくは非イオン性両親媒性物質との間の会合性質は、文献で論じられてきた。この観点を考察したものとして、Khalafallaら、IEEE Trans. Magnetics, vol. MAG-16, No. 2, 178-183 (March 1980)を参照。その他の活性成分のうちアンフォテリシンBのような物質の場合、活性成分分子の官能基のイオン性電荷（アンフォテリシンBのアミノ基における正電荷等）と、例えば、脂肪酸またはフォスファチジン酸における負の電荷の頭部基との間に相互作用が生じると考えられている。活性成分と両親媒性物質との間に働く共有結合も、適切に利用すれば、これらの分子または粒子を会

合性がある。この会合性相互作用は、例えば、リン脂質非混合性物質であって、カプセル層と混合しない相を形成する活性成分を含有するものを使用するもの（Searsら、米国特許第4,288,594号）とは区別される。

両親媒性物質の親水性部分としては、例えば、カルボキシル基、水酸基、アミノ基、ホスファート基、もしくはスルファート基等を含む荷電または非荷電基が挙げられる。また、両親媒性物質の疎水性部分としては、例えば、ポリオキシエチレン、および少なくとも1個の芳香族基および/または脂環式基で置換した脂肪族基等の飽和または不飽和脂肪族炭化水素基が挙げられる。

特に好ましい両親媒性物質は、後に論ずるような脂肪酸である。これらは、天然に存在する脂肪酸または合成脂肪酸の孰れであっても、またそれらの誘導体であってもよい。その他、適当な両親媒性物質としては、例えば、フォスファチジルコ

合させることができる。

適切な両親媒性物質の選択は、活性成分との会合性を考慮し、さらに、両親媒性物質の非極性もしくは疎水性部分の性質に依存して行われよう。この場合の両親媒性物質は、親水性部分と疎水性（すなわち、親脂性）部分の両方を有する分子でなければならない。本発明の実施に適した両親媒性物質は、その親水基を介して上記の活性成分が会合し得るものである。さらに、両親媒性物質に不可欠の性質として、活性成分との会合によって生じる両親媒性物質基質粒子（AAS）がカプセル層と適合し、会合するという点が挙げられる。例えば第2図および第3図に示したように、この会合は、両親媒性物質会合基質-カプセル化物質中におけるAASの「可溶化」の性質を有するとも見られる。また、第4図で例示した如く、AASとカプセル化物質の疎水性部分間での疎水性（親脂性）相互作用からこの種の会合現象の生じる可

リン（レシチン）、フォスファチジルエタノールアミン（ケファリン）、フォスファチジン酸、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルグリセロール、ジフォスファチジルグリセロール（カルジオリピン）、アラスマロゲン、リソフォスファグリセリド等のリン脂質ならびに関連化合物、およびこれらの合成飽和化合物が挙げられる。その他、リン脂質ではないが適当な両親媒性物質として、ジグリセリドならびにトリグリセリド、疎水基置換アルコール、疎水基置換アミン、疎水基置換フォスフェートならびに疎水基置換スルフェート、アルキルエーテルアシルグリセロール、グリコシルアシルグリセロール、スフィンゴリピド（スフィンゴミエリン等）、グリコスフィンゴリピド（セラブロシド等）、フィトール、レチノール、およびビタミンA、K、EならびにD等のビタミン類が挙げられる。

本発明で使用する両親媒性物質の中では、脂肪

酸ならびにその誘導体が好ましい。炭化水素鎖は、飽和または不飽和の鎖れであってもよい。脂肪酸もしくはその他の両親媒性物質における炭化水素鎖の長さは、外側の生物学的適合性物質の、両親媒性物質／活性成分構造のカプセル化作用を高めるに最適なものに調節する。このことは今度はそれぞれの鎖の長さは、リン脂質カプセル化剤等の疎水性部分の性質に応じて決まる。さらに、両親媒性物質／活性成分構造の全体サイズは、両親媒性物質の性質によって決まり、最終的に調製される所望の構造の運搬担体を得る能力に影響を与える（第2図ないし第4図、および上記関連部分の考察を参照）。

本発明における好ましい両親媒性物質の1例は、炭素数約10ないし28の炭化水素鎖を有する脂肪酸である。特に好ましいものは、炭素数14ないし24の脂肪酸である。外側のカプセル化物質がジステアロイルフォスファチジルコリンならび

液処理等の既知の方法によって達成し得る。液相超音波処理またはその他の方法（活性成分の所与量と組み合わせられる両親媒性物質の濃度ならびに量を最適にすることが望ましいもの）では、処理すべき活性成分濃集体の表面積と活性成分表面の一部を占める両親媒性物質の立体サイズ（steric size）とを比較することによって、初めに至適濃度を推定することができる。実際には、両親媒性物質の濃度範囲にはある程度の幅がある。また、最終の運搬担体制剤における活性成分濃度の至適調製は、両親媒性物質の初期濃度の最適化に左右されることが実験的に分かっている。第5図に、本発明のマグネタイト運搬担体に関連したNMR T₂緩和速度増大(NMR T₂ relaxation rate enhancement)の幅広ピークを示す。これは、パルミチン酸初期濃度が、約6 mg / 2.5 ml（パルミチン酸／出発マグネタイト分散液）のときに観察されたものである。同様の最適化は、本発明の

にコレステロール等のリン脂質であって、活性成分がマグネタイトである場合、両親媒性物質には、テトラデカン酸（炭素数14）、パルミチン酸（炭素数16）、ドコサン酸（炭素数22）、およびテトラコサン酸（炭素数24）が特に好ましい。実際には、テトラデカン酸およびパルミチン酸等の炭素数の比較的短い両親媒性物質が、無毒という観点から好ましいと見られ~~得る~~。パルミチン酸は、活性成分がアンフォテリシンBのときにも好ましい。炭素数約10ないし約20、特に炭素数16ないし18（1分子当たり鎖2本）の飽和または不飽和炭化水素鎖のフォスファチジン酸は、アンフォテリシンBに対して特に好ましい両親媒性物質である。正電荷の極性基を有する両親媒性物質は、活性成分が負電荷もしくは電子供与体の場合に、極めて有用と考えられている。

両親媒性物質と活性成分との混合は、ボールミル(bore milling)、ホモゲナイズ、ならびに超音

他の調製剤でも達成し得る。

活性成分、両親媒性物質、ならびに生物学的適合性外用物質の超音波処理は、例えば、マイクロチップ付きのアローブ(Ultrasonics社製)を用い、電力約50Wないし90Wにて実施することができる。通常、超音波処理は約15分で十分である。超音波処理温度は、両親媒性物質の融点もしくは相点領域を超えるものが好ましい。

活性成分と両親媒性物質とを超音波処理した後、一層以上の適当なカプセル層を同様の超音波処理または当該分野の他の方法によって付加し、生物学的適合性運搬担体を得る。本発明で生物学的適合物質として特に好ましいものは、リン脂質およびリン脂質／コレステロール混合物である。適切なリン脂質は、単独にまたは混合物として使用し得るものであって、天然に存在するリン脂質および合成リン脂質の双方（フォスファチジルコリン、フォスファチジン酸、フォスファチジルセリン、

フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルグリセロール、およびフォスファチジリンシトール)がけられる。リン脂質物質は、(例えば、精製卵黄に由来する)天然形態であることもできるし、または例えば、合成の飽和炭化水素脂質を有する合成形態とすることもできる。ステロール、ステロールエステル、またはその他の物質(コレステロール、コレスタノール、コレスタン、トコフェロール等を含む)も、カプセル層に含有させて、運搬担体の安定性を高めたり、膜の透過性を調節することができる。この目的には、コレステロールが特に好ましい。

特に、ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)とコレステロール(CHOL)との混合物は、運搬担体のカプセル化にとって好ましい物質である。その2:1(DSPC:CHOL)の混合物が本発明では効果的である。他の好ましいリン脂質としては、ジパルミトイルフォスファ

シ得る。

運搬担体の表面をリボソームの表面を変えるときとはほぼ同一の方法で修飾し、*in vivo*の異なる成分学的分布図を与えることができることは自明である。そのような修飾法としては、例えば、モノクローナル抗体もしくは特異的結合特性を有するリガンドの付着、または糖脂質の取り込みが挙げられる。この種の修飾に関しては、以下の文献に記載が見られる: Schmidt(編集)「薬物運搬キャリアとしてのリボソーム(Liposomes as Drug Carriers)」(Symposium Tubingen, 1984年10月, George Thieme Verlag (Stuttgart: 1988)), Ostro(編集)「リボソーム(Liposomes)」(Marcel Dekker, Inc. (New York: 1983)), ^{日本}Gregoriadis(編集)「リボソームの技術(Liposome Technology)」第2巻(CRC Press, Inc. (Boca Raton, Florida: 1984))。なお、上記文献における間

チジルコリン(DPPC)、ジミリスティルステロイルフォスファチジルコリン(DMPC)、およびこれら以外に炭化水素鎖の炭素数が約10ないし約20のリン脂質が挙げられる。

特定の調製に用いる際、リン脂質の濃度および量を有意に変化させても、良好な最終組成物が得られる。典型的な濃度は、本明細書の実施例において示す。超音波処理は、両親媒性物質に用いるときと同一の条件下で実施することができる。次いで、混合物を約16,000Gで約10分間遠心し、その上清をフィルターにかけると、本発明の組成物を含む溶液が得られる。

適当な外層の付加も、MLVの調製で一般に用いられる方法によって可能である。従って、多層構造の生物学的適合性外層は、例えば、リン脂質の相転移温度を上回る温度での約60分間の沸き置けにより、両親媒性物質含有基質の水性懸濁液中にてリン脂質膜を水和することによって付加

示は、ここに引用して本明細書の一部とする。

本発明の運搬担体は、注射(例えば、静脈内注射、腹腔内注射または筋肉内注射)、吸入、経口投与、局所塗布、眼内投与等を含む医療技術の分野で周知の方法で投与することができる。また、適切な投与量は、本明細書に記載するような、組織試料を対象とした生物学的分布試験を含む既知の動物試験および臨床試験によって決定することができる。

(以下余白)

実施例 1マグネタイト懸濁液の調製

15 mg/ml のマグネタイト PBS (リン酸緩衝食塩水) のアリコート 25 ml を様々な量のパルミチン酸 (2.4 ~ 10 mg) と共に 15 分間 66°C にて超音波処理 (SOW) した。この結果得られた懸濁液を、総て同一条件下で、 ^{14}C および ^3H の放射性ラベルした DSPC: CHOL が 2:1 の脂質膜 46 mg と共に超音波処理した。生成した懸濁液を 15600 G にて 10 分間遠心分離し、その上清を 220 nm のフィルターを通過させた。最終溶液の外観は、乳白色 (パルミチン酸 2.4 mg) — DSPC: CHOL が 2:1 の小さい単層ベシクルと黄褐色 (パルミチン酸 6 mg) に亘っていた。彩色度 (intensity of coloration) はパルミチン酸 6 mg で最大に達し、色調 (gradation of color) はその最大値まで増加するが、それ以上のパルミチン酸濃度では白へと

上記の操作は、5, 15, 20, および 50 mg/ml のマグネタイト PBS を使用して繰り返した。第 5 図に示すように、パルミチン酸量の関数として T_1 緩和定数 (T_1 : relaxation rate) をプロットした。

マグネタイト濃度 10 mg/ml に相当する試料中の鉄を以下の順序で分析した: アリコート 100 μl を、65°C にて 30 分間、0.1 M の HNO_3 900 μl 、5 M の NH_4SCN 100 μl 、およびヘプタノール 1.4 ml と共に攪拌しながら加熱した。存在する鉄を酸化的に可溶化すると、水相に鮮紅色の $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ が生成し、続いてこれをヘプタノール中へ $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ として完全に抽出した。FeCl₃ 標準液でのモル吸光係数を用いて測定したヘプタノール溶液の 498 nm における吸光度から、 $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ を定量した。ヘプタノールはパルミチン酸の脂肪酸エステル化および抽出するのに必要である。そうしないとパルミ

チン酸はマグネタイト粒子表面に疎水性保護コーティングとして付着し続けるからである。第 6 図に、 T_1 緩和定数 ($1/T_1$) と鉄濃度との相関関係を示すが、後者は脂質の一定濃度に対して標準化してある。

第 1 表

パルミチン酸 (mg)	T_1 (msec)	$1/T_1$ (msec^{-1})
2.4	162	6.2
3.6	70	14.3
4.8	60	16.7
6.0	46	21.7
7.2	92	10.9
10.0	173	5.8

チン酸はマグネタイト粒子表面に疎水性保護コーティングとして付着し続けるからである。第 6 図に、 T_1 緩和定数 ($1/T_1$) と鉄濃度との相関関係を示すが、後者は脂質の一定濃度に対して標準化してある。

実施例 2マグネタイト懸濁液の調製 (スプレー乾燥法)

250 mg/ml のマグネタイト懸濁液 12 ml を PBS で 30 ml に希釈し、続いて、パルミチン酸 12 重量% (すなわち、360 mg) をクロロホルム 5 ml に加えたものと共に超音波処理した。この結果生じた懸濁液を 200°C でスプレー乾燥し、黒色粉末としてマグネタイトの両親媒性物質会合基質 (AAS) 物質を得た。50 mg のこのマグネタイト AAS を PBS 5 ml 中で超音波処理して粉末を分散した。その結果得られた懸濁液を前記の条件下で 92 mg の DSPC: CHOL が 2:1 である混合物と共に超音波処理にかけた。遠心分離

および220nmのフィルターによる透過を行った後、透明な黄褐色溶液を得た。

実施例3

マグネタイト懸濁液の調製(2相法)

中間体のマグネタイトAASは、2相法によっても調製できた。パルミチン酸19.6mgをクロロホルム2mlに溶解した。そして、この溶液を、マグネタイト62.5mgを含むPBS5mlと共に15分間冷水浴中で穏やかに超音波処理した。この結果得られた混合物を遠心分離にかけると、上の水相にマグネタイトAASの沈殿が生じ、下の有機相がこれによって被われた。ピペット操作でクロロホルムを除去し、乾燥窒素ガスの泡を水相と沈殿物を通して吹き込んだ。AASを超音波処理にかけて再分散した後、上記の実施例と同様に、さらに92mgのDSPC:CHOLが2:1である混合物と共に超音波処理し、遠心分離および透過を行った。透過後得られた溶液は、濃い黒色を

について、組織緩和時間への「*in vivo*」効果調べた。パルミチン酸5mg、5mg/mlのマグネタイトPBS2ml、および40mgのDSPC:CHOLが2:1である混合物から、17.5mg/mlの脂質を有する黄褐色溶液が得られた。PBSによるこの溶液の2.5:1希釈液も調製した。EMT6腫瘍組織をBalb/c雄マウスの側腹部に移植し、10日間増殖させた。10日目に、マウスに200μlの可溶化マグネタイト溶液または対照緩衝液を静注した。24時間後、マウスを殺して試料組織を切除し、PBSで洗浄し、吸取紙を当て、重さを測り、プラスチックバックに封入した。切除した組織のNMR緩和時間を測定した。第3表に測定結果を示すが、これによれば、 T_1 以上に T_2 が影響を受けて緩和定数の増大(実測定数-対照定数)が認められる。

第3表

定数増大(生体分布データ)

呈していたが、薄い膜にして観察すると、透明なコレレート色であった。鉄の分を行ったところ、マグネタイト(Fe_3O_4)濃度は3.6mM以上であった。この溶液をPBSにより40、100、および250倍に希釈して得られた液体の緩和定数を第2表に示す。

第2表

希釈率	T_2 (msec)	$1/T_2$ 増大(sec ⁻¹)
1:250	15	66
1:100	6	166
1:40	<4	>250
対照	1850	0

(注):

$$1/T_2(\text{増大}) = 1/T_2(\text{実測}) - 1/T_2(\text{対照})$$

すなわち、定数増大 = 実測定数 - 対照定数

実施例4

MRI T_2 対比

前記実施例1の方法で可溶化したマグネタイト

$\Delta(T_2^{-1})(s^{-1})$	肝臓	脾臓	脾臓
17.5mg/ml	4.44	4.64	9.23
7.0mg/ml	2.16	2.40	6.78

= 5.75と3.53との平均

$\Delta(T_2^{-1})(s^{-1})$	肝臓	脾臓	脾臓
17.5mg/ml	0.50	0.44	0.43
7.0mg/ml	0.30	0.38	0.48

実施例5

マグネタイト懸濁液の生体分布の時間経過

可溶化マグネタイトを、8mg/mlのマグネタイトPBS5ml、パルミチン酸12mg、およびDSPC:CHOLが2:1である脂質膜を用いた実施例1の方法に従って調製した。各群3匹から成る担腫瘍Balb/c雄マウスに、対照溶液のPBS200μl(1つの群)、またはマグネタイト溶液200μl(3つの群)を静脈内注射した。マグネタイト投与マウスは、注射の4、16、および

24時間後に殺し、対照群マウスは、注射の27時間後に殺した。直ちに組織を摘出し、IBMミニスベック20を用いて T_1 および T_1 緩和時間を測定した。組織での平均緩和定数($1/T_1$ 及び $1/T_1$)を各組織に対し時間の関数として第7図および第8図に示す。なお、 $t = \infty$ に於ける対照値も記入した。明らかに、マグネタイト運搬担体は数時間かかって血液から除去されるが、これとは著しく対照的にマグネタイト粒子(コーティングの有無に拘わらず)の血中からの除去時間は一般に約5分である。

実施例6

組織緩和時間の用量依存性

実施例1と同様に、リボソームマグネタイトを調製し、PBSで50:1希釈し、0.80 μ mおよび0.22 μ mのフィルターで濾過し、膜外濾過で濃縮して、8 μ g/ μ lのDSPC(高圧液体クロマトグラフィーで測定)を含む最終溶液を得た。

よび血液における T_1 の有意な増大は生じないが、 T_1 の増大は認められている。この事実は、そのままの完全な粒子にも当てはまる。脾臓については、用量依存特性を考慮すれば、粒子は可溶化濃度の飽和を生ぜず、ある程度溶解することが推測できる。

実施例7

脂肪酸エステル性物質の肝運搬

マグネタイト含有運搬担体⁵、炭素数6ないし24の様々な脂肪酸の等モル量を用いて実施例1の方法に従って調製した。それぞれの場合、マグネタイトAASは、脂肪酸を8 μ g/ μ lのマグネタイトPBS5 μ lと共に60℃での超音波処理、続いて100 μ gのDSPC:CHOLが2:1である脂質膜と共に25℃での超音波処理によって調製した。リボソーム可溶化マグネタイト溶液が、溶液の着色、および様々なPBS希釈液で観察される T_1 緩和定数の増大により⁵証明されるように、

この溶液の様々な用量、および対照PDS溶液200 μ lを担体⁵Balb/cマウスに静注した。注射して24時間後、組織を摘出し、 T_1 および T_1 緩和時間を測定した。 $1/T_1$ および $1/T_1$ の用量依存性を、第9図および第10図に示す。 $1/T_1$ の有意な増大は、そのままの完全なマグネタイト粒子(intact magnetite particles)が存在するときだけに認められる。それは、マグネタイトの溶解によって、鉄原子の磁気モーメント間の協同相互作用が除去されるためである。可溶化マグネタイトの $1/T_1$ は、溶液中に存在する常磁性鉄種に比較して増大すると見られている($1/T_1$ の僅かな増大も可能)。第9図および第10図における肝臓での結果から、次のような推測が可能である。低用量では肝臓に到達する総てのマグネタイトは可溶化されているが、高用量では粒子可溶化濃度が飽和に達し、そのままの完全な粒子によって T_1 緩和の増大がもたらされる。肝臓お

それぞれの場合で生成した。代表的な結果を第11図に示す。

実施例8

リン脂質組成物の範囲

リボソーム可溶化マグネタイトは、約8 μ g/ μ lのマグネタイトPBS5 μ lならびにバルミチン酸約12 μ gを用いて実施例1の方法に従って調製した。最後に、等モル量の脂質膜(DSPC:CHOL=1:1ないし3:1の範囲の組成物)と共に65℃での超音波処理を実施した。脂質のモル量は、DSPC:CHOL=2:1の混合物100 μ gに均しかつた。PBS⁵の10:1希釈における最終溶液における、 T_1 緩和定数(R_1)を第4表に示す。

第4表

DSPC:CHOL	$R_1(\text{sec}^{-1})$
1:1	23.8
1.5:1	23.3

2.0:1	29.4
2.5:1	10.0
3.0:1	8.8

実施例9温度依存性

リボソームマグネタイトを、8 mg/mlのマグネタイトPBS溶液5 mlおよび全体で12 mgのドコサン酸（ベヘン酸）から実施例1の方法に従って調製した。最後の超音波処理段階で種々の温度を採用した結果、マグネタイトの取り込み効率が温度に依存することが立証された。最終溶液の10:1希釈液の緩和定数は、超音波処理温度の低下に伴って増大した。公称85℃の超音波処理（nominal 85℃ sonication）（最終温度の測定値74℃）では、 R_2 は1.4 sec⁻¹であったが、公称25℃の超音波処理（最終温度の測定値45℃）では、 R_2 は27.8 sec⁻¹に増大した。氷水浴（5℃以下）での最終超音波処理によれば、 R_2 は更

地したところ、出発物質の40%取り込み率に相当する0.4 mg/mlの値を得た。

実施例11ミコナゾール遊離剤の調製および分析

ミコナゾール（1-[2,4-ジクロロ-β-[(2,4-ジクロロベンジル)-オキシ]フェニル]イミダゾールニトレート）は、かなり強力な抗真菌薬である。しかし、この薬剤の使用は、水溶性、およびin vivoでの毒性ならびに運搬の問題によって幾分制限されている。ミコナゾール10 mgを、10 mM Tris-HCl緩衝液5重量%ブドウ糖溶液5 ml中で5分間の室温ブローブ超音波処理によって分散させた。この懸濁液にジステアロイルフォスファチジン酸（DSPA）10 mgを加えて混合物とし、これを15分間65℃にて超音波処理し、白色のミコナゾールAAS懸濁液を得た。今度はこれを120 mgのDSPA:CHOLが2:1である脂質膜に加え、65℃にて15分間超音波処理した。

に31.3 sec⁻¹まで増大した（完了時の測定温度は41.0℃）。しかし、後者の場合、最終生成物を0.22 μmのフィルターで濾過することは困難であった。

実施例10アンフォテリシンB遊離剤の調製

抗真菌薬のアンフォテリシンB 5 mgを、10 mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)5重量%ブドウ糖溶液5 ml中で超音波処理し、不溶性薬剤の分散液を調製した。続いて、この分散液を、パルミチン酸15 mgと超音波処理し、さらに40 mgのDSPC:CHOLが2:1である混合物と超音波処理した。生じた懸濁液を15分間18000 Gで遠心分離し、その上清を220 μmのフィルターで濾過して透明な黄色溶液を得た。そして、アンフォテリシンBの分光化学分析、すなわち、アルコール中溶液の1:100希釈液に関して405 nmの吸光度（ $E = 1.309 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）の測定を興

結果として得られたリボソーム含有溶液を15分間12500 rpmで遠心分離し、そして0.45 μmならびに0.22 μmのフィルターで連続して濾過した。最終溶液は、ミコナゾールに関し、減圧下で高真空乾燥し、DMF抽出し、そして273 nmでのUV吸光度測定によって分光光度測定分析した。この分析によれば、薬剤の取り込み率は95%を上回ることが分かった。最終溶液のin vitro有効性は、カンジダ・アルビカンスの増殖抑制（成育培地におけるカンジダ・アルビカンスの濃度を425 μgの吸光度で測定）により試験した。第12図には、100 μg/mlの遊離薬剤、100 μg/mlのリボソームミコナゾール、およびミコナゾールなしで処理したカンジダ・アルビカンス培養液の3つの同一アリコートの425 μg吸光度（最初の吸光度に対する比）を時間の関数として示した。この図から、遊離およびリボソームミコナゾール処理により、in vitroにて顕著な増殖抑制が

同程度生じることが判明した。

実施例 1.2

ビスアントレン運搬担体の調製

ビスアントレン (9,10-アントラセンジカルボキシアルデヒド-ビス-[4,5-ジヒドロ-(1H-イミダゾール-2-イル)ヒドラゾン]-ジヒドロクロリド) は、酸性水溶液に溶解する強力な化学療法剤である。しかし、血中では、溶解せずに沈澱して、毒性をもたらす。ビスアントレンの二塩酸塩の水溶液 (蒸留水 5 ml に対して薬剤 20 mg) を過水酸化ナトリウム溶液 (1 M) を滴下¹² アルカリ性としたところ、不溶性遊離塩基の沈澱を生じた。この沈澱を遠心分離によって分離し、薬剤の PBS 懸濁液の pH が約 7.4 に低下するまで PBS で洗浄した。そして、懸濁液の全容を 5 ml に調節した。続いて、これを 4 mg のパルミチン酸と共に超音波処理した。65℃で約 5 分間の超音波処理を実施したところ、薄黄色のビスアントレン A

約 12 mg のジパルミトイルフォスファチジン酸 (DPPA) を添加した後、懸濁液を 10 分間 65℃にて再び 80 W の超音波処理にかけた。初めの黄色の溶液ならびに懸濁液から、ブルーのシスプラチン AAS 物質が得られた。この AAS 懸濁液を 5% ブドウ糖溶液で 5 ml に希釈し、続いて 100 mg の DPSC:CHOL の 2:1 混合物と共に 25℃にて超音波処理した。5 分間 12500 rpm の遠心分離後、生成溶液を 0.22 μm のフィルターで濾過すると、外観は小さな単層ベシクル溶液に類似した溶液が得られた。この溶液は、透過光を当てると淡黄色を呈したが、散乱光では青みがかっていた。最終溶液中の¹²シスプラチン量は、ジエチルチオカルバメートとの 2:1 複合体生成反応、及びこの溶液のクロロホルム抽出液の 254 nm における UV 吸収測定により分析した。溶液 5 ml 中の最終プラチナ濃度は 0.66 mg/ml で、約 51% の薬剤が取り込まれていた。リボソームと薬剤

AS が生じた (マグネタイト AAS の生成に類似)。このビスアントレン AAS を 5 ml の PBS に再懸濁し、この懸濁液を 100 mg の DPSC:CHOL が 2:1 である脂質膜と共に 15 分間 65℃にて 80 W の超音波処理した。この結果、不透明な黄白色の溶液が生じ、この溶液を 0.22 μm のフィルターで濾過すると、最後にビスアントレンのリボソーム可溶化調製物が得られた。薬剤の存在は、溶液の色調によって確認した。

実施例 1.3

シスプラチン運搬担体の調製および分析

シスプラチン (シス-ジアミンジクロロプラチナ (II)) は著名な化学療法剤であるが、重大な臨床毒性、特に腎毒性の発現する成れのある薬剤である。10 mg のシスプラチンを 5% ブドウ糖溶液 2 ml 中で 2 分間 65℃にて 80 W のプローブ超音波処理によって溶解ならびに懸濁した。シスプラチンは幾分溶解するが、残りは溶液中に懸濁した。

の会合は、溶液をセファデックス G50/80 を充填したカラム上のクロマトグラフィーにかけると、単一バンドの移動が認められたことで証明できた。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は典型的なリボソーム運搬担体を表す拡大図。

第 2 図は活性成分相が両親媒性物質分子と会合してカプセル化物質¹²二重膜の層間領域に取り込まれた本発明の運搬担体を表す拡大図。

第 3 図は単分子の活性成分相または活性成分の小粒子相が単分子の両親媒性物質と会合してカプセル化物質の二重膜の層間領域に取り込まれた本発明の運搬担体を表す拡大図。

第 4 図は活性成分相が両親媒性分子と会合して単一層のカプセル化物質内にカプセル化された本発明の運搬担体を表す拡大図。

第 5 図は活性成分 (マグネタイト) の取り込み

量またはNMR緩和定数増大(NMR relaxation rate enhancement)と両親磁性物質調製濃度との相関関係を示すグラフ図。

すグラフ図である。

第6図はNMR緩和定数増大と取り込まれた活性成分(マグネタイト)濃度との相関関係を示すグラフ図。

本願人 ヤスチー・インコーポレイテッド
代理人 弁護士 川 口 義 雄
代理人 弁護士 中 村 武 彦
代理人 弁護士 船 山 武

第7図は様々な生体分布系におけるNMR T₁緩和定数増大の時間依存性を示すグラフ図。

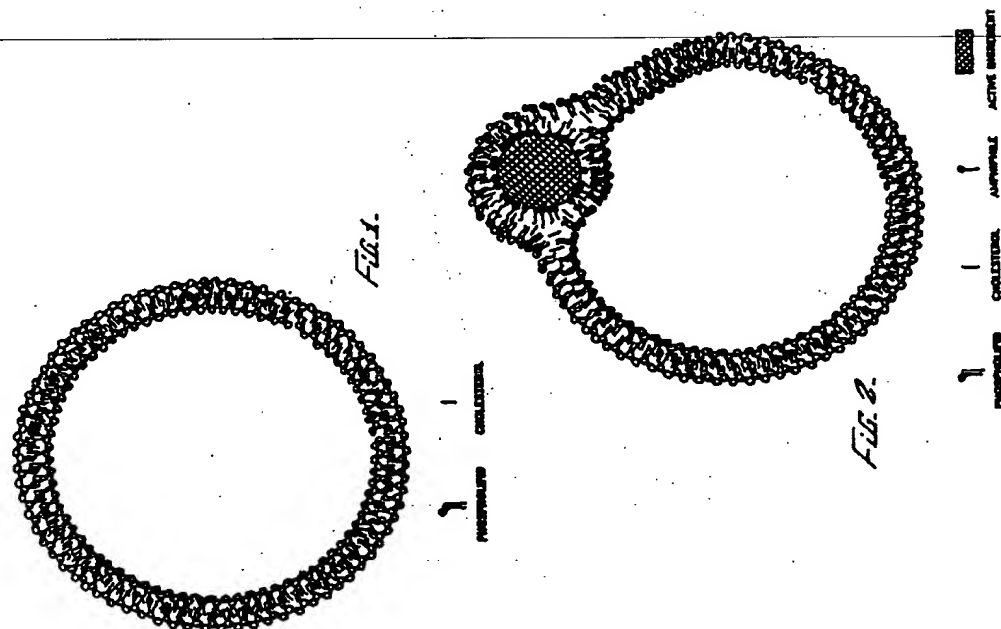
第8図は様々な生体分布系におけるNMR T₁緩和定数増大の時間依存性を示すグラフ図。

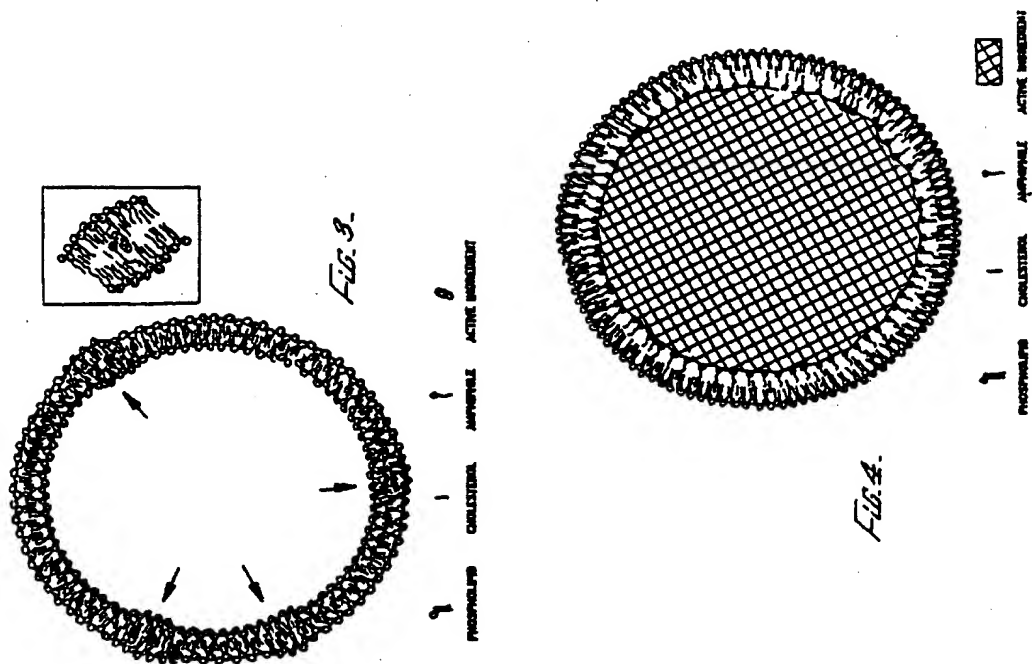
第9図は様々な生体分布系におけるNMR T₁緩和定数増大の用量依存性を示すグラフ図。

第10図は様々な生体分布系におけるNMR T₁緩和定数増大の用量依存性を示すグラフ図。

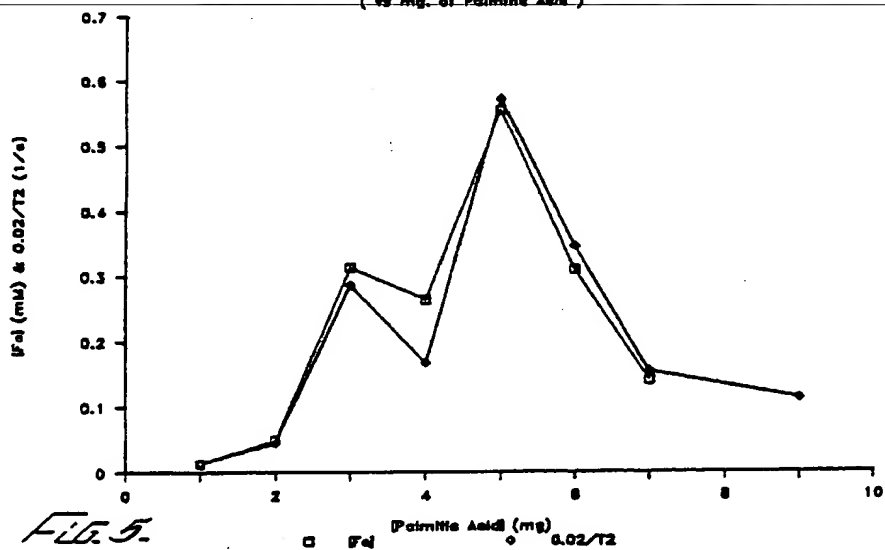
第11図はNMR緩和定数増大と両親磁性物質の鎖長間の相関関係を示すグラフ図。そして

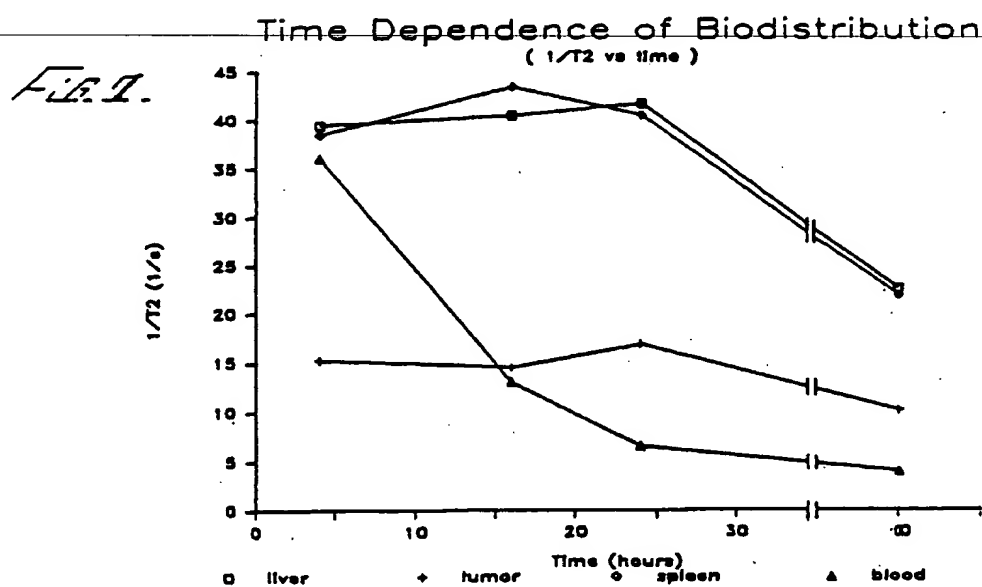
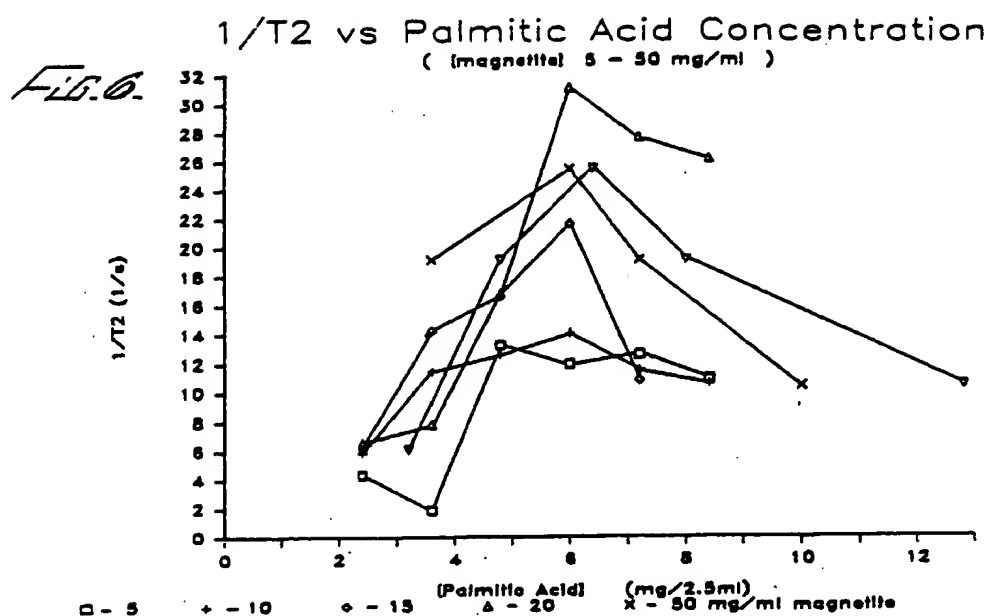
第12図は本発明の活性成分(ミコナゾール)通量担体の存在下で真菌の増殖の時間依存性を示





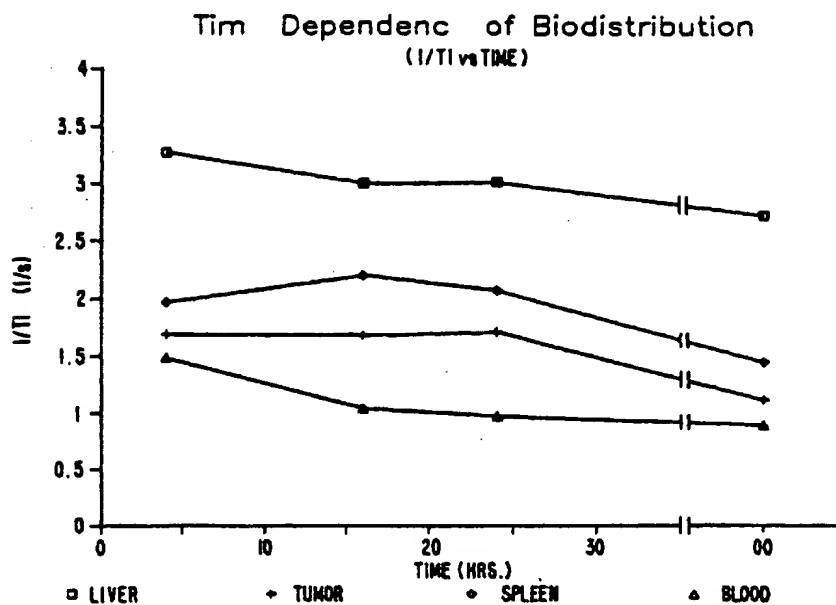
Correlation Between [Fe] and $1/T_2$
(vs. mg. of Palmitic Acid)





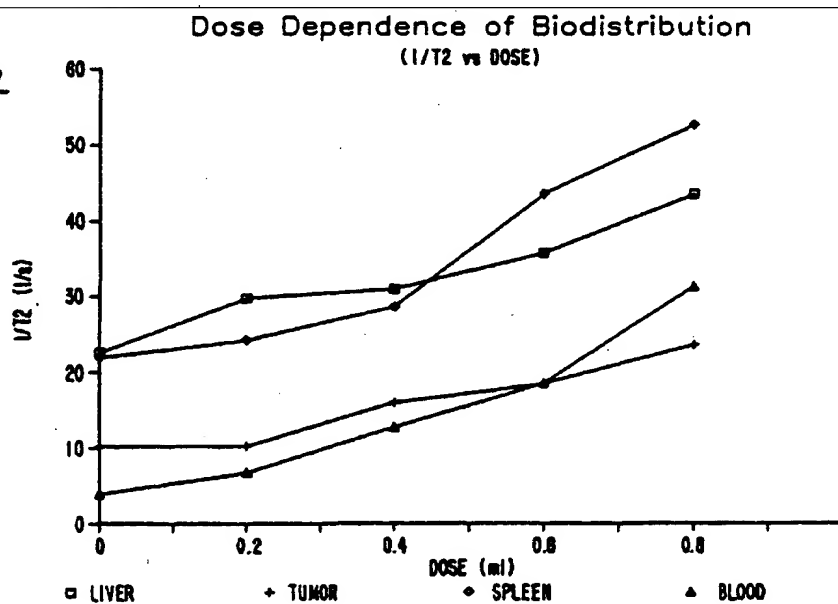
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG. 8.



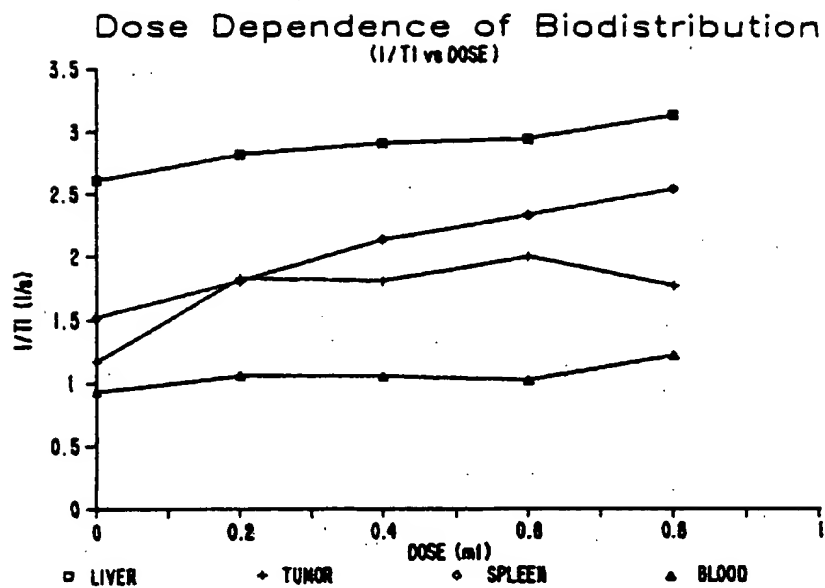
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG. 9.



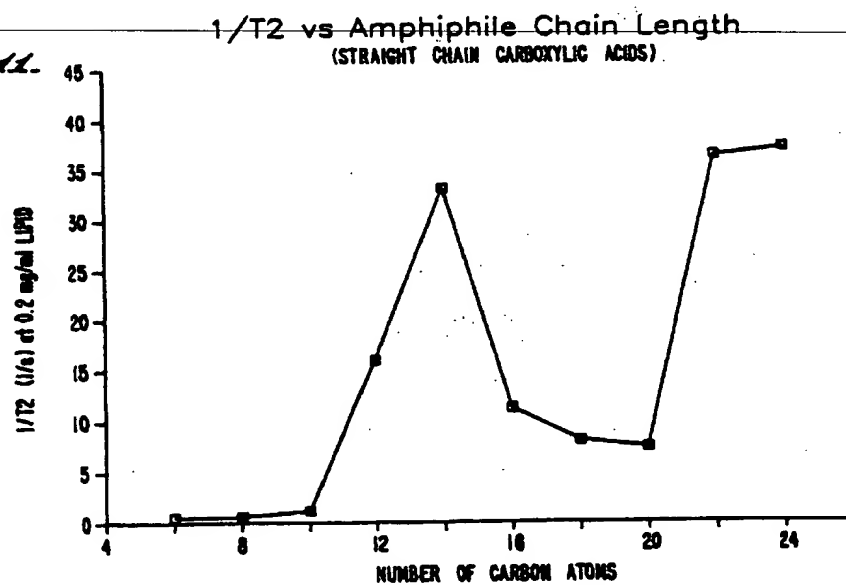
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG. 10.



図面の浄書(内容に変更なし)

FIG. 11.



Candida Albicans Test of Miconazole

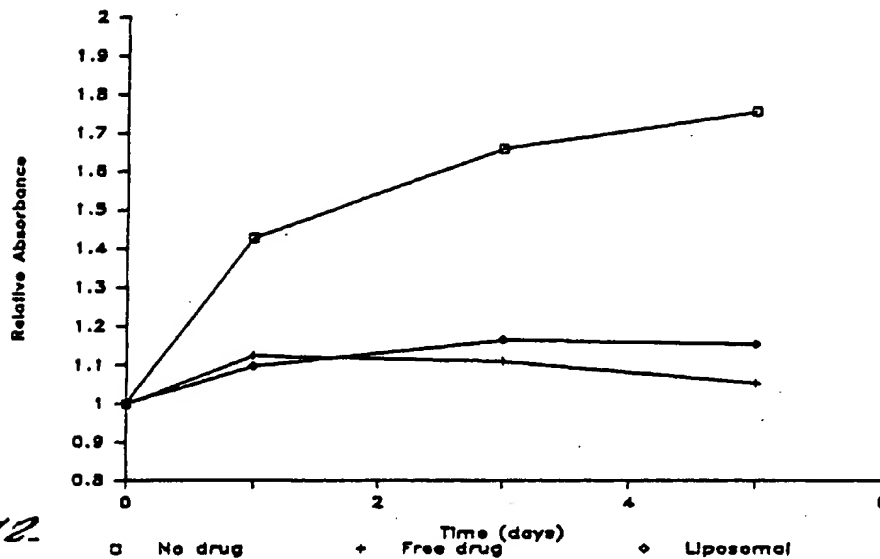


FIG. 10.

手続補正書 (方式)

昭和63年4月6日

特許庁長官 小川 邦夫 閣

1. 事件の表示 昭和62年特許願第317282号

2. 発明の名称 両親水性物質と全所性成分を取り込んだ運搬担体

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人

名 称 ベスター・インコーポレイテッド

4. 代 理 人 東京都新宿区新宿 1丁目 1番14号 山田ビル
(郵便番号 160) 電話 (03) 354-8823
(6208) 弁護士 川口 誠
(ほか2名)

5. 補正指令の日付 昭和63年3月2日

6. 補正の対象 願書中、出願人の代表者の圖、圖面及び委任状

7. 補正の内容

- (1) 黒色で鮮明に描いた適正な図面 (第8~11図) を別紙の通り補充する。(内容に変更なし)
- (2) 出願人の代表者を記載した適正な願書及び委任状については本願に添する昭和63年3月18日付の手続補正書 (自発) にて提出致しました。